

Aus dem II. Anatomischen Institut
Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der
Freien Universität Berlin
Leiter: Professor Dr. med. Willy Schwarz

ÜBER DEN ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN NACHWEIS
VON TRITIUM MARKIERTEM THYMIDIN IN VERSCHIEDENEN
ZELLEN MIT HILFE DER AUTORADIOGRAPHIE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

1960

vorgelegt von
Thomas Neuber
aus Nürnberg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem II. Anatomischen Institut
Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der
Freien Universität Berlin
Leiter: Professor Dr. med. Willy S c h w a r z

Über den elektronenmikroskopischen Nach-
weis von Tritium markiertem Thymidin in
verschiedenen Zellen mit Hilfe der Auto-
radiographie.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
N e u b e r , Thomas
aus Nürnberg

Dekan: Professor Dr.med. Hans Wolfgang S p i e r
Referent: Professor Dr.med. Willy S c h w a r z
Korreferent: Professor Dr.med. Wilhelm M a ß h o f f



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 29. Januar 1968

In großer und dankbarer Verehrung meinem väterlichen Freund
Gustav H. F r a n c k zugeeignet.

Inhaltsverzeichnis

Schrifttumsverzeichnis	4
Einleitung	
Grundlagen	7
Methodische Problematik	8
Historische Übersicht	9
Artefaktentstehung, "background"-Bildung	11
Material und Methode	12
Biologisches Material	13
Eigene Methode	14
Bereitung der Emulsion	14
Expositionszeit	17
Entwicklung	
Chemische Entwicklung	17
Physikalische Entwicklung	18
Entfernung der Gelatine	20
Befunde	21
Diskussion	24
Ungelöste Probleme	26
Zusammenfassung	27
Danksagungen	28
Lebenslauf	29
Abbildungen	30

Schriftumsverzeichnis

- (1) Agar, H.D. and Douglas, H.C.. Studies of the cytological structure of yeast. J. Bacteriol. 1957 73, 365.
- (2) Bahr, G.F.. Osmiumtetroxide and Rutheniumtetroxide and their reaction with biologically important substances. Exp. Cell. Res. 1954 7, 457.
- (3) Barton, A.A.. Studies of budding and cellwall structure of yeast. J. gen. Mikrobiol. 1950 4, 84.
- (4) Bernhard, W., Bauer, A., Gropp, A., Hagenau, F. et Oberling, C.H.. L'ultra-structure du nucleole de cellules normales et cancéreuses. Exp. Cell. Res. 1955 9, 88.
- (5) Bernhard, W.. Ultrastructural aspects of nucleo-cytoplasmic relationship. Exp. Cell. Res. Supp. 1958 6, 17.
- (6) Bernhard, W. et Leduce, E.. L'avenir de l'utilisation de matières plastiques hydrosolubles en cytochimie ultrastructurale. V. Intern. congress for electron microscopy 1962. Acad. Press N.Y. London, 1 4.
- (7) Boyd, G.A.. Autoradiography and Medicine. Acad. Press N.Y. 1955.
- (8) Budd, G.C. and Pelc, S.R.. The membran method of electron microscop autoradiography. Stain Technol. 1964 39, 295
- (9) Caro, L.G. and van Tubergen, R.P.. High resolution in autoradiography. I. Methods. J. Cell. Biol. 1962 15, 173.
- (10) Caro, L.G.. High resolution in autoradiography. II. The problem of resolution. J. Cell. Biol. 1962 15, 189.
- (11) Davis, G.A.. A series of structural changes found in the mammalian nucleolus just before the prophase of mitosis. Proc. Europ. reg. Congr. on electron microscopy Delft 1960 Springer-Verlag Bln. 739.
- (12) Eidinoff, M.C., Fitzgerald, P.J., Simmez, E.B. and Knoll, J.E.. Intracellular localisation of compounds labeled with tritium-H by radio autography. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 1951 77, 225.
- (13) George, L.A. and Vogt, G.S.. Electron microscopy of autoradiographed radioaktiv particles. Nature 1959 184, 1474.
- (14) Granboulan, P.. Resolving power and sensitivity of a new emulsion in electron microscop autoradiography. J. Royal Mic. Soc. 1963 81, 165.
- (15) Haase, G. und Jung, G.. Über die Herstellung dünn-schichtiger Emulsionsfilme. Naturwissenschaften 1964 51, 404.

- (16) Hampton, J.C. and Quastler, H.. Combined autoradiography and electron microscopy of thin sections of intestinal epithelial cells of the mouse labeled with H-thymidine. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1961 10, 140.
- (17) Harbers, E.. Autoradiographie als histochemisches Untersuchungsverfahren. *Handbuch der Histochemie Bd. I/1*, 412 Grundlagen G. Fischer-Verlag Stuttgart 1958.
- (18) Hashimodo, T., Conti, S.F. and Naylor, H.B.. Studies of the fine structure of microorganisms. *J. Bacteriol.* 1959 77, 344.
- (19) Hay, E.D. and Revel, J.P.. The fine structure of the DNP component of the nucleus. *J. Cell. Biol.* 1963 16, 31.
- (20) Huxley, H.E. and Zubay, G.. Preferential staining of nuclei acid containing structures for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1961 11, 273.
- (21) Karnovsky, M.J.. Simple methods of staining with lead at high pH in electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1961 11, 729.
- (22) Kayes, J., Maunsbach, A.B. and Ullberg, S.. Electron microscopic autoradiography of radioiodine in the thyroid using the extranuclear electron of J^{125} . *J. Ultrastruc. Res.* 1962 7, 339.
- (23) Koehler, J.K., Mühlenthaler, K. and Freywyssling, A.. An improved technique for producing thin films and its application to H^3 -thymidine labeled maize nuclei. *J. Cell. Biol.* 1963 16, 73.
- (24) Lettré, H. und Paweletz, H.. Probleme der elektronenmikroskopischen Autoradiographie. *Naturwissenschaften* 1966 11, 268.
- (25) Liquier-Milward, J.A.. A track radioautography study of the inter-cellular localisation of cobalt in neoplastic tissues. *Biochim. et Biophys. Acta* 1954 14 459.
- (26) Liquier-Milward, J.A.. Electron microscopy and radioautography as coupled techniques in tracer experiments. *Nature* 1956 177, 619.
- (27) Matejec, R. und Meyer, R.. Elektronentheorie der photographischen Entwicklung. *Zschr. f. wschftl. Photogr.* 1963 57, 18.
- (28) Meek, G.A. and Moses, M.J.. Localisation of trinitiated thymidine in HeLa-cells by electron microscopy autoradiography. *J. Roy. Micr. Soc.* 1963 81, 165.
- (29) Merker, H.J., Palme, G. und Liss, E.. Membranstrukturen in den Kernen von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen nach Einwirkung von Cyclophosphamid (Endoxan). *Naturwissenschaften* 1966 9, 229.
- (30) Moses, M.J.. Patterns of organisation in the fine structure of chromosomes. IV. Intern. Kongress für Elektronenmikroskopie Berlin. Springer Verlag 1960 Bd. II 199.

- (31) O'Brien, R.T. and George, L.A.. Preparation of autoradiograms for electron microscopy. *Nature* 1959 183, 1461.
- (32) Oenlert, W. und Lesch, R.. Autoradiographische Untersuchungen an menschlichen Geweben und Zellen. *Dtsch. med. Wschr.* 1966 43, 1940.
- (33) Przybylski, R.J.. Electron microscopy autoradiography. *Exp. Cell. Res.* 1961 24, 181.
- (34) Reiner, C.. In elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden. Springer-Verlag Bln 1959.
- (35) Salpeter, M.M. and Bachmann, L.. Assesemnts of technical steps in electron microscopic autoradiography. *Symosia of the international society of cell biology. Vol 4 Acad. Press N.Y.* 1965.
- (36) Schwarz, W. und Merker, H.J.. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Innenversilberung der Sehnenfibrillen. *Histochemie* 1959 1, 225.
- (37) Silk, M.H., Hawtrey, A.E., Spence, I.M. and Gear, J.H.S.. A method for intercellular autoradiography in the electron microscope. *J. Biophys. Biochem. Cytology* 1961 10, 577.
- (38) Stoeckenius, W.. Electron microscopy of DNA molecules stained with heavy meta salts. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1961 11, 297.
- (39) Watson, M.C.. Staining of tissues sections for electron microscopy with heavy metals. II. Application of solutions containing lead and barium. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1958 4, 722.
- (40) Yasuzumi, G. and Sugihara, R.. The fine structure of nuclei as revealed by electron microscopy. *Exp. Cell. Res.* 1965 37, 207.

Über den elektronenmikroskopischen Nachweis von Tritium markiertem Thymidin in verschiedenen Zellen mit Hilfe der Autoradiographie.

Einleitung

Nach der zunächst rein deskriptiven Betrachtungsweise in der biologischen makroskopischen und mikroskopischen Morphologie treten nun die dynamischen Vorgänge in der Zelle in den Vordergrund der Betrachtung. Durch die Histochemie konnten hierin grundlegende Erkenntnisse gewonnen werden. Neue Möglichkeiten ergaben sich durch die Einführung der Isotope, die jedoch zunächst mehr in der Biochemie Verwendung fanden. Für die Morphologie besonders in der mikroskopischen Betrachtungsweise konnte durch die Einführung der Autoradiographie ein Weg gefunden werden, der es ermöglicht, dynamische Vorgänge in Geweben und Zellen zu untersuchen.

Grundlagen

Unter Autoradiographie versteht man den Nachweis einer radioaktiven Substanz innerhalb eines Gewebes durch die Wirkung der von ihr ausgesendeten Strahlung auf eine für diese Strahlung empfindliche Schicht (7). Isotope sind chemische Elemente, die radioaktive Strahlung emittieren, die auf Reaktionen im Atomkern dieser Elemente zurückzuführen sind. Die für die radioaktive Strahlung empfindliche Schicht besteht aus einer Silberhalogenidkristall-Emulsion, wie sie in der Photographie Verwendung findet. Durch die radioaktive Strahlung erfolgt an einem oder mehreren Silberhalogenidkristallen eine im Prinzip gleiche physikalisch-chemische Veränderung, wie sie durch die Quanten der Lichtstrahlung in der Photographie erzeugt wird. Es entsteht durch die radioaktive Strahlung in dem getroffenen Silberhalogenidkristall nämlich ein sogenanntes latentes Korn. Dieses ist ein Keim von atomarem Silber, dessen Größe von der Energie abhängig ist, die das beschleunigte Teilchen der radioaktiven Strahlung beim Auftreffen auf das Silberhalogenidkristall verloren hat (17). Dieses latente Korn wird durch die Behandlung mit reduzierenden Substanzen vergrößert. Man nennt diesen Vorgang *Entwicklung* des Kornes. Dann werden die nicht getroffenen Silberhalogenidkristalle durch ein geeignetes Lösungsmittel herausgelöst, was als *Fixation* bezeichnet wird.

Gibt man nun einem Versuchstier eine stoffwechselpflichtige Substanz, an die ein Isotop chemisch gebunden ist, so läßt sich mit Hilfe der Autoradiographie die Lokalisation dieses Stoffwechsels in Abhängigkeit zur Zeit bestimmen. Wenn man nämlich im einfachsten Falle Totalschnitte dieses Versuchstieres mit Photoemulsion bedeckt

und nach Ablauf einer bestimmten Expositionszeit mit photographischen Entwickler- und Fixationslösungen behandelt, so werden durch die radioaktive Strahlung solche Stellen auf der Photoemulsion als geschwärzte Punkte zu erkennen sein. Die mit dem Isotop markierte Substanz hat sich also zum Zeitpunkt der Tötung des Versuchstieres unter den geschwärzten Stellen befunden. Es ist verständlich, daß sich mit Hilfe dieser Methode eine morphologische Ortung dynamischer Vorgänge in Geweben und Zellen gewinnen läßt. Andererseits sind dem Untersucher durch die enge Verknüpfung von morphologischer und photographischer Präparationstechnik besondere Probleme erwachsen, auf die an späterer Stelle eingegangen werden soll.

Methodische Problematik

Zunächst wurde die Autoradiographie in der Lichtmikroskopie zu einer Standardmethode entwickelt, wobei wesentliche neue Kenntnisse über den zeitlichen Ablauf biologischer Vorgänge gewonnen werden konnten. Da jedoch das Auflösungsvermögen des Lichtmikroskopes eine klare Begrenzung der Aussagekraft dieser Methode setzte, wurden schon bald Versuche unternommen, die Autoradiographie auch im elektronenoptischen Bereich anzuwenden.

Im Elektronenmikroskop können bei hoher Vergrößerung immer nur kleine Ausschnitte von sehr geringer Dicke betrachtet werden. Deshalb wird es wünschenswert sein, die elektronenmikroskopische Autoradiographie mit der lichtmikroskopischen zu kombinieren. Während in der Lichtmikroskopie Gewebsschnitte von etwa einer Zelldicke zur Untersuchung kommen, müssen die Gewebsschnitte in der Elektronenmikroskopie so dünn sein, daß sie nur den Bruchteil der Dicke einer Zelle beinhalten. Durch die in den letzten Jahren ständig verbesserten Ultramikrotome ist es heute möglich, ohne große Schwierigkeit ultradünne Serienschnitte von ungefähr 500 Å herzustellen, sodaß man auf diese Weise das dreidimensionale Gesamtbild von Geweben und Zellen wiedergewinnt. Die als Objektträger in der Elektronenmikroskopie verwendeten Kupfernetzblenden eignen sich für die Untersuchung von Serienschnitten nicht so gut, weil zu viele Ausschnitte des Objektes verdeckt werden, sodaß von uns Lochblenden verwendet wurden. Für die Autoradiographie im elektronenoptischen Bereich ist die geringe Schnittdicke noch von besonderer Bedeutung, da hier auch die Konzentration der in dem Gewebeschnitt befindlichen strahlenden Substanz geringer sein wird. Diese Konzentration ist nämlich maßgebend für die Expositionszeit, die um so länger sein wird, je niedriger die radioaktive Strahlung des Gewebeschnittes ist.

Eine andere Schwierigkeit ergibt sich aus der Fixations- und Einbettungsmethode, die in der Elektronenmikroskopie verwendet werden, da durch sie manche nicht an hochmolekulare Stoffe sowie an Fette gebundene Bestandteile herausgelöst werden können. Es ist deshalb nur sinnvoll, solche strahlenden Substanzen zur Untersuchung zu verwenden, deren Lokalisation im Gewebe durch die präparativen Bearbeitungsgänge nicht verändert werden (24).

Die Zahl der in der elektronenmikroskopischen Autoradiographie verwendbaren Isotope ist ebenfalls sehr begrenzt. Es eignen sich hierfür besonders sogenannte Weichstrahler. Man versteht darunter Isotope mit geringer Zerfallsenergie, deren Strahlung beim Auftreffen auf die Photoemulsion stark abgebremst wird, dabei eine hohe Ionisationsdichte entwickelt und dadurch eine geringe Strahlungsweite besitzt. Über diese Eigenschaften verfügt neben dem Isotop J^{125} besonders das Wasserstoffisotop Tritium (H^3), das schon sehr früh auch für die lichtmikroskopische Autoradiographie als das ideale Isotop betrachtet wurde (12). Da Wasserstoff in nahezu allen biologischen Substanzen enthalten ist, sind die Darstellungsmöglichkeiten tritiumhaltiger Verbindungen für autoradiographische Untersuchungen theoretisch beinahe unbegrenzt.

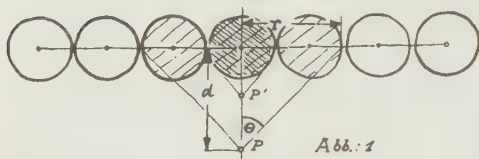
Historische Übersicht

Die ersten Versuche wurden von Liquier-Milward 1956 und von O'Brien und George 1959 durchgeführt (26, 31). Dabei fanden Emulsionen Verwendung, die damals der lichtmikroskopischen Autoradiographie zur Verfügung standen, und die in erster Linie für die kernphysikalischen Untersuchungen an energiereichen kleinsten Teilchen verwendet wurden (sog. Kernspuremulsionen). Damit konnten auch autoradiographische Versuche im elektronenoptischen Bereich durchgeführt werden. Heute stehen dem Untersucher verschiedene sehr feinkörnige Emulsionen zur Verfügung mit einer Korngröße zwischen 1500 Å und 350 Å, z.B. die Emulsionen L4 von Ilford sowie NUC 7.15 und 3.07 von Agfa-Gevaert.

Die Zubereitung der Emulsion sowie die Beschichtung des Objektschnittes mit dieser strahlenempfindlichen Schicht sind für den Untersucher äußerst schwierig. Dabei muß verlangt werden, daß die Emulsion eine einschichtige geschlossene d.h. dichtgepackte Filmschicht von Silberhalogenidkristallen bildet, die möglichst eng auf dem Objektschnitt liegt (9). Je weiter nämlich der Strahlungspunkt im zu untersuchenden Objekt von der strahlenempfindlichen Schicht entfernt liegt, um so größer wird der geometrische Fehler

sein d.h. der Unterschied zwischen der Projektion des Strahlungspunktes in der Emulsionsebene und der Lage des getroffenen Kornes bzw. der getroffenen Körner (10). Die von Salpeter und Bachmann (35) für diesen Fehler formulierte Gleichung lautet:

$$r = d \operatorname{tg} \theta$$



r Fehler

d Abstand des Strahlungspunktes P von der Emulsionsebene

θ Winkel zwischen der Vertikalen und der Richtung, in der die radioaktive Strahlung die Strahlungsquelle verläßt

Im Laufe der Entwicklung der elektronenmikroskopischen Autoradiographie wurden verschiedene Wege beschritten, um dieses Problem zu lösen. Silk und seine Mitarbeiter (37) bedampften das Objekt mit Silber und Brom und bedeckten es danach mit einer dünnen Gelatineschicht. Sie bekamen auf diese Weise zunächst eine gleichmäßige Schicht von Silberkörnern mit einem Durchmesser zwischen 150 Å und 450 Å. Nach der Brombedampfung flossen jedoch einige Körner zu etwa 1100 Å großen Aggregaten zusammen, wodurch in der Schicht größere Lücken entstanden. Eine einfache Methode ist das Auftropfen der geschmolzenen und verdünnten Emulsion auf die Netze mit den Objektschnitten. Hierzu werden vorher die Objektträgernetze auf einen Glasobjektträger befestigt (8, 32). Eine Einsichtigkeit der Silberbromidkristalle ist jedoch nach unserer Erfahrung nicht mit genügender Sicherheit zu erreichen. Eine andere Methode ist das Eintauchen der auf Glasobjektträger befestigten Kupfernetzblenden in die Emulsion (14). Nach unserer Erfahrung bringt die Eintauchmethode gegenüber der vorhergenannten keine besseren Ergebnisse. Köhler und seine Mitarbeiter versuchten diese Methode zu verbessern (23). Sie versetzten jede einzelne Blende in der Zentrifuge in hohe Umdrehung und erst dann pipettierten sie die geschmolzene Emulsion darauf. Durch die Zentrifugalkraft sollte sich die Emulsion gleichmäßig dünn über die ganze Blende verteilen. Die anfangs geforderte gleichmäßig dicht gepackte Anordnung der Silberbromidkristalle in der Schicht konnten jedoch damit nicht befriedigend erreicht werden. Von George und Vogt (13) wurde erstmals der Versuch unternom-

men, mit Hilfe einer Drahtschlinge, die in die geschmolzene Emulsion eingetaucht wird, einen dünnen, einschichtigen und dichtgepackten Film zu erzeugen. Mehrere Untersucher griffen dieses Verfahren auf und versuchten es durch Variation zu verbessern. Die Form der Schlinge sowie die Vorbehandlung und Konzentration der Emulsion wurden verändert (9, 15, 16, 22).

Artefaktentstehung, "background"-Bildung

Wie für viele anderen wissenschaftlichen Arbeitsmethoden stellt sich auch für die elektronenmikroskopische Autoradiographie die Frage nach Artefakten. Das sind vor allem entwickelbare Körner, die nicht durch die Strahlung der in dem Gewebe vorhandenen Isotope erzeugt wurden. Diese unspezifischen Körner, im angloamerikanischen Schrifttum als "background" bezeichnet, können auf die verschiedenste Weise entstehen. Die ständig vorhandene Höhenstrahlung ist eine unbekannte Größe, deren Wirkung nur schwer beeinflusst werden kann. Liquier-Milward (25) konnte seine Präparate dem Einfluß der Höhenstrahlung entziehen, indem er sie in einem stillgelegten Bergwerk 600 m unter der Erdoberfläche exponierte. Weil aus den schon erwähnten Gründen längere Expositionszeiten in der elektronenmikroskopischen Autoradiographie nötig sind, kann die Höhenstrahlung für die "background"-Entstehung neben anderen Ursachen mitverantwortlich sein.

In jedem biologischen Material sind reduzierende Potentiale vorhanden, die in freien SH-Gruppen an der Schnittoberfläche, sowie in diffusiblen reduzierenden Stoffen des Gewebes zu suchen sind. Da jedoch in der elektronenmikroskopischen Fixationstechnik starken Oxydationsmitteln z.B. Osmiumtetroxyd, Kaliumpermanganat u.a. die Fixation des Gewebes obliegt, kann angenommen werden, daß freie reduzierende Gruppen an der Schnittoberfläche, sowie diffusible reduzierende Stoffe im Gewebe nicht mehr vorhanden sind. So gelingt die Versilberung (formalinfixierter) Kollagenfibrillen nach Osmiumfixierung nicht mehr (36).

Quantitative Untersuchungen solcher Einflüsse liegen noch nicht vor, sodaß sich eine endgültige Aussage hierüber noch nicht machen läßt.

Aus den Untersuchungen über die Schleierbildung in der Photographie ist jedoch bekannt, daß bereits geringe Spuren von Kupfer in der Emulsion erhebliche Störungen verursachen können. Eine Überlegung macht dies verständlich. Silber steht in der Spannungsreihe der Metalle weiter auf der Seite der edleren Metalle als das Kupfer.

Das unedlere Metall jedoch verdrängt das edlere aus seinen Salzen. Dies bedeutet aber, daß reines metallisches Kupfer zum Beispiel für das Silberbromid in der Emulsion eine reduzierende Substanz darstellen kann. In der Elektronenmikroskopie kommen heute vorwiegend Kupfernetzblenden zur Anwendung. Sie sind somit für autoradiographische Untersuchungen nicht geeignet.

Die von Salpeter und Bachmann (35) beschriebene "sandwich"-Methode beläßt deshalb das zu untersuchende Material auf einem Glasobjektträger, der vorher mit einem Colloidinfilm versehen wurde. Nach einer Kohlebedampfung zur Stabilisation wird dann das Präparat mit einer Pipette oder einer Schlinge mit Emulsion beschichtet. Nach der Exposition (auf dem Glasobjektträger) erfolgt die Entwicklung und Fixation. Jetzt nach Abschluß der einen nämlich photographisch-chemischen Arbeitsgänge wird das fertige Autoradiogramm auf eine Wasseroberfläche abflottiert und auf Kupfernetzblenden gebracht. Mit dieser Methode wird der Einfluß des Kupfers auf die Emulsion ausgeschaltet.

Ziel unserer Untersuchungen war, durch Vergleich der bisher veröffentlichten Methoden, sowie durch Variation, eine möglichst einfache Arbeitsmethode mit einem möglichst hohem Auflösungsvermögen zu entwickeln. Dabei sollten die Silberfadenknäuel, wie sie bei der Mehrzahl der bis jetzt bekannten Methoden vorkommen, vermieden werden und dafür tatsächliche Körner zur Darstellung kommen. Damit könnte eine Ortung der Vorgänge bereits auf die Membran eines Zellorganelles vorgenommen werden.

Material und Methode

Bei unseren Versuchen in der Reproduktion der bisher veröffentlichten Methoden mußten wir feststellen, daß sich im Laufe der Expositionszeit ein ständig zunehmender, an den Balken der Kupfernetze sich verdichtender "background" entwickelte. Den Einfluß auf die "background"-Entstehung bei der Methode von Salpeter und Bachmann konnten wir nicht untersuchen, da sich bei unseren Versuchen die Präparate nicht unbeschädigt von der Glasoberfläche ablösen ließen. Wir stellten uns aus diesem Grund für die weiteren autoradiographischen Versuche Lochblenden aus Silber her.

Mittels einer Lochstanze werden aus 0,1 mm dickem Silberblech (Degussa) kreisförmige Scheiben vom Durchmesser der gebräuchlichen Kupfernetzblenden gefertigt. In diese wird mit der in Abb. 2 gezeigten Vorrichtung mitten ein Loch von 1 mm Durchmesser gestoßen. Die

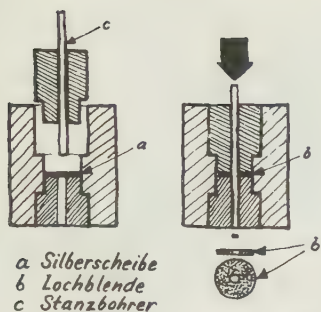


Abb. 2

so entstandenen Lochblenden werden in 2n HNO₃ kurz abgeätzt, in aqua bidest. gespült und anschließend in absolutem Äthanol gewaschen. Auf die übliche Weise erfolgt die Bedeckung mit einem Formvafilm.

Bei der Verwendung dieser Blenden konnte das Auftreten der oben beschriebenen "background"-Bildung nicht mehr beobachtet werden, obwohl die gleichen Emulsionschargen sowie Expositionsbedingungen gewählt wurden.

Als Versuchsobjekt verwendeten wir H³-Thymidin markierte Zellen, da hiermit die DNS-Neosynthese durch mehrere Arbeiten verschiedener Autoren autoradiographisch sowohl histologisch (32) als auch elektronenmikroskopisch untersucht wurde und hinreichend bekannt war (19,28).

Biologisches Material

1. Epithelzellen aus Dünndarmkrypten, sowie Zellen aus dem Hoden der Ratte wurden untersucht.

Dem Versuchstier wurden 5 μ C/kg (3C/mMol) i.p. appliziert und nach 24 Stunden wurde es getötet. Der Dünndarm und Hoden wurden zuerst in 2%-iger Glutaraldehydlösung (Michaelis-Puffer pH 7,42) und anschließend mit 1%-iger Osmiumsäure fixiert, anschließend in der aufsteigenden Azeton-Reihe entwässert und schließlich in Vestopal-W eingebettet. Nach Feststellung der markierten Krypten und Tubuli contorti durch lichtmikroskopisch-autoradiographische Untersuchung, wurden mit dem Ultratom LKB blaßgoldene Serienschritte von diesen Präparatstellen angefertigt, die auf die oben beschriebenen Silberlochblenden aufgenommen wurden. Da sich der Trägerfilm (Formva) auf den Lochblenden gegenüber allen weiteren Bearbeitungsgängen als sehr empfindlich erwies, wurde ein Teil der Blenden vor und ein anderer Teil nach der Schnittaufnahme mit Kohle bedampft. Ein signifikanter Unterschied in der Haltbarkeit dieser beiden Blendenreihen gegenüber den unbedampften konnte jedoch nicht festgestellt werden.

2. Ehrlich Ascites Tumorzellen.

Den beimpften Mäusen (ca. 20g) wurde 50 μ C (3C/mMol) i.p. verabreicht. Die Tiere wurden nach 2 Stunden getötet. Die Weiterverarbeitung, der aus der Bauchhöhle gewonnenen Zellsuspension erfolgte sinngemäß wie oben.

3. Hefezellen.

Wir züchteten eine Bäckerhefe (Norddeutsche Hefe-Industrie) in einer Nährlösung bei 30°C unter Luftbegasung an.

Zusammensetzung der Nährlösung:

10,00 Bäckerhefe		
0,25 Magnesiumsulphat · 7 H ₂ O	20,0	Glucose
0,25 Calciumchlorid	60 mMol	Ammoniumhydrogensulphat
3,0 Amoniumsulphat	25 mg	Streptomycin
1,0 Glycin	15 mg	Penicillin-G Natrium
1,5 Hefeextrakt	ad 1000,0	aqua dest..

Nach 24 Stunden wurden 5 ml der entstandenen Suspension (Nährlösung und sich vermehrende Hefezellen) in einem besonderen Gefäß, das einen Zusatz von 10 μ C (3C/mMol) H³Thymidin hatte, zwei Stunden weiter bei gleicher Temperatur begast. Anschließend erfolgten Fixation und weitere Bearbeitung sinngemäß wie oben beschrieben.

Eigene Methode

Nach den Vorversuchen, in denen wir die bisher beschriebenen Methoden zu reproduzieren versuchten, entschieden wir uns für die Schlingen-Methode, weil wir mit ihr die besten Ergebnisse hinsichtlich des entstandenen Filmes beobachten konnten. Wir stellten fest, daß in Metallschlingen weniger leicht und gleichmäßig ein dünner Emulsionsfilm entsteht, als in Schlingen aus dünn ausgezogenen Glasstäben oder auch in solchen aus Nylonsaiten (Gitarrensaiten). Wegen der Zerbrechlichkeit der Glasschlingen, entschieden wir uns für solche aus Nylon. Zur Manipulation der Schlinge, sowie um den Emulsionsfilm leichter parallel auf die Blenden aufbringen zu können, bedienten wir uns eines Porter-Blum Ultramikrotoms mit Handradantrieb. Die Schlinge wurde zu diesem Zweck in einer Gelatine kapsel, wie sie für Einbettungen verwendet wird, am Griff in Vestopal-W eingebettet, sie konnte so in das Blockfutter des Schneidearmes eingespannt werden; als Halterung für die Präparate wurde ein Holzstab in die Glasmessernaltevorrichtung eingespannt. Auf diese Weise kann die Lage der Silberlochblende mit den zu bedeckenden Schnitten in der horizontalen Ebene unter der Schlinge beliebig verändert werden. Dadurch hat der Untersucher die Möglichkeit nach Entstehung des Emulsionsfilmes in der Schlinge, die Blende unter der besten Stelle des Filmes in Stellung zu bringen. Hierzu Abb. 3a.

Bereitung der Emulsion

Bei unseren Versuchen verwendeten wir die Emulsionen L4 von Ilfort sowie NUC 7.15 und NUC 3.07 von Agfa-Gevaert. Die in Gelform ge-

Abb. 3a

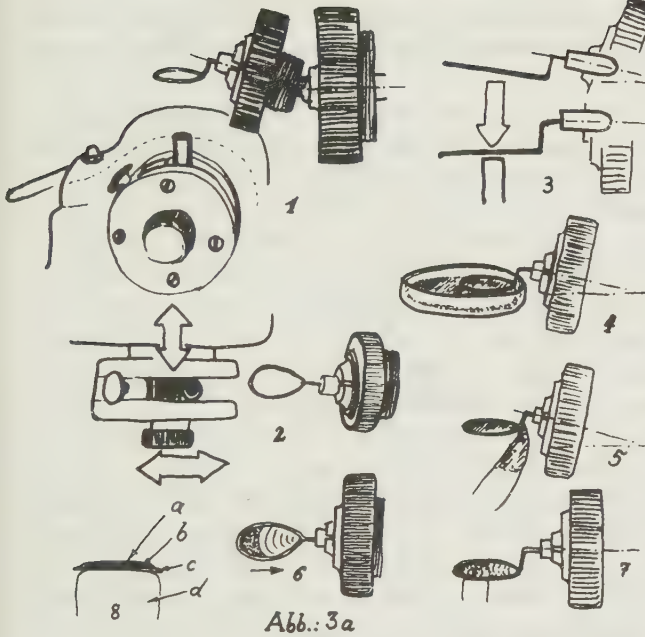


Abb.: 3a

1. In die Messerhalterung wird ein Holzstab eingespannt, im Blockfutter die Nylon-schlinge befestigt.
2. Die auf dem Holzstab gelegene Blende ist so horizontal beliebig veränderbar.
3. In der oberen Stellung ist die von der Schlinge umschriebene Ebene gekippt, in der unteren parallel zur Holzstaboberkante.
4. In der oberen Stellung wird die

Schlinge durch Anheben der Schale in die Emulsion getaucht.

5. Die überflüssige Emulsion wird abgesaugt.

6. Die Gelierung des Filmes schreitet in Pfeilrichtung fort.

7. In der unteren Stellung wird der Film parallel aufgebracht.

8. Der Film haftet auf der Blende und dem darunterliegenden Filterpapierblättchen. a Emulsionsfilm, b Blende, c Filterpapierblättchen, d Holzstab.

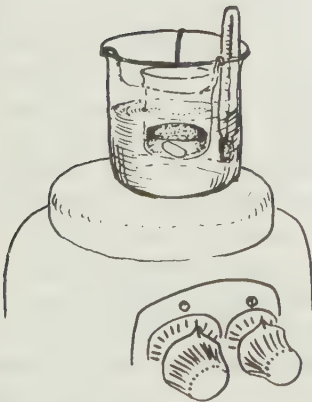


Abb.: 3b

Abb. 3b

Vorrichtung zum Schmelzen der Emulsion.

lieferte Emulsion muß zunächst verdünnt und geschmolzen werden. Wir verdünnten ein Gramm gelförmige Emulsion NUC 7.15 bzw. 3.07 mit 1,25 ml aqua bidest..Hierzu fügten wir 5 Tropfen einer 0,05%-igen Natriumlaurylsulphat-Lösung.Ein Gramm gelförmige Emulsion L4 verdünnten wir mit 1,00 ml aqua bidest..Auch hier fügten wir den oben angeführten Zusatz zur Herabsetzung der Oberflächenspannung hinzu.Das Schmelzen der Emulsion erfolgte im Wasserbad unter ständigem Rühren bei 50°C.Wir bedienten uns eines Magnetrührgerätes mit stufenlos regelbarer thermostatisch kontrollierter Heizplatte. Hierzu Abb.3b.Die so bereitete Emulsion wird über Nacht bei Kühlschranktemperatur in einem lichtdichten Behälter aufbewahrt und nach erneutem Schmelzen bei 45°C ist sie fertig zur weiteren Verarbeitung.Die Emulsion wird nun in einem vorgewärmten Petrischalenendeckel etwa 2-3 mm dick ausgegossen.Die montierte Nylonschlinge taucht man nun in die Schicht,indem die Schale von unten gegen die Schlinge gehoben wird.Der Schneidearm des Ultramikrotoms befindet sich dabei in der oberen Stellung.In dieser Lage steht der so entstandene Film etwas nach hinten abgekippt,sodaß sich dort die überflüssige Emulsion ansammelt und mit Filterpapier abgesaugt werden kann.Danach bringt man die Schlinge in horizontale Stellung.Man vermeide hierbei jeglichen Luftzug,da sich sonst Unregelmäßigkeiten bei der Gelierung des Filmes ergeben.Als nützlich erwies sich der Gebrauch einer Nasenmundmaske.

Während der Emulsionsfilm in der Schlinge geliert,wird auf den Holzstab ein kleines Filterpapierblättchen (mit einem Bürolocher aus Filterpapier ausgestantzt) gelegt.Auf die Mitte dieser Unterlage wird die Blende mit den zu beschichtenden Schnitten gelegt. Der gelierte Film wird jetzt über der Blende betrachtet,und die Dicke sowie die Einschichtigkeit desselben mit Hilfe der Interferenz in der Dunkelkammerbeleuchtung beurteilt.Wir verwendeten die für Röntgen-Material gebräuchliche Dunkelkammerbeleuchtung.Die Halterung mit dem Holzstab wird nun so eingestellt,daß die Blende unter der besten Stelle des Filmes steht.Danach wird dieser durch Drehung am Handrad des Ultramikrotoms auf die Schnitte aufgebracht.Der Film haftet nun zunächst auf der Unterlage und legt sich dann sehr eng beim Trocknen den Objektschnitten an.Man vermeide es,beim Herunternehmen der Blende vom Holzstab,mit der Pinzette die noch feuchte Emulsion zu berühren,da dies die ganze Arbeit zerstören würde.Nach Trocknung bei Zimmertemperatur wird das Präparat vorsichtig von der Unterlage gelöst und zweckmäßiger Wei-

se in eine LKB-Gridbox gelegt, wodurch die Registrierung erleichtert wird. Alle Arbeiten mit der unentwickelten und unfixierten Photoemulsion müssen verständlicher Weise in der Dunkelkammer erfolgen. Wir lagerten unsere Präparate in einem Exsiccator mit CaCl_2 unter Lichtabschluß bei 0°C .

Expositionszeit

Die Expositionszeit lag bei unseren Versuchen zwischen 3 Wochen und 3 Monaten. Sie ist abhängig von der Konzentration an strahlender Substanz im Gewebe.

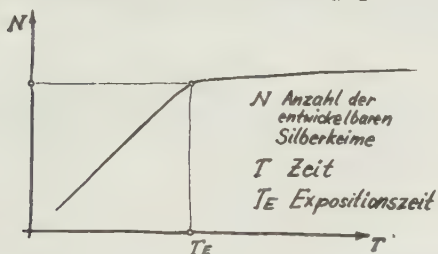


Abb. 4

Durch Entwickeln einzelner Präparate einer Versuchsreihe in regelmäßigen Zeitabständen wird die richtige Expositionszeit ermittelt. Sie ist dann erreicht, wenn sich die Anzahl der entwickelbaren Silberkeime nicht

mehr proportional zum Expositionsintervall vermehrt.

Entwicklung

Die Entwicklung des entstandenen Silberkeimes ist für das Auflösungsvermögen des Autoradiogrammes von entscheidender Bedeutung. Die physikalisch-chemischen Vorgänge des photographischen Entwicklungsprozesses sind durch die Untersuchungen von Matejec und Meyer (27) genauer bekannt geworden. Im wesentlichen sind zwei Komponenten der Entwicklerlösung von Bedeutung. Einerseits wird durch ein Lösungsmittel das Silberbromidkristall aufgelöst, andererseits werden durch die reduzierende Komponente die in Lösung gegangenen Silberionen zu metallischem Silber reduziert. Diese so entstandenen kleinsten Silberteilechen scheiden sich durch elektrostatische Kräfte bedingt an dem durch die ionisierende Energie der radioaktiven Strahlung gebildeten primären Silberkeim ab. Für die Form des entwickelten Kornes ist es von Bedeutung, welche der beiden Reaktionen mit höherer Geschwindigkeit abläuft.

Chemische Entwicklung

Ist das reduzierende Potential im Verhältnis zur Konzentration an auflösender Substanz groß und somit die Auflösungsgeschwindigkeit relativ niedrig, so lagert sich das reduzierte Silber einseitig, kontinuierlich an den Primärkeim an. Dieser ist dann nämlich noch an einigen Seiten von ungelöstem Silberbromid umgeben. So entsteht ein Silberfilament, dessen Länge in erster Linie von

der Entwicklungsdauer abhängig ist. Das eine Ende dieses Silberfadens ist der Ort, an dem die radioaktive Strahlung auf das ursprüngliche Silberbromidkristall eingewirkt hat. Es läßt sich jedoch im Elektronenmikroskop nicht feststellen, welches der beiden Enden diese Wechselwirkung zuzuordnen ist, zumal dann, wenn durch Überlagerung und Knäuelung des Silberfadens die Beurteilung noch zusätzlich erschwert wird.

Diese sogenannte chemische Entwicklung ergibt einen Fehler, den Salpeter und Bachmann (35) folgendermaßen definierten:

$$X_{\max} = A + \frac{B}{2}$$

- A Durchmesser des AgBr-Kristalles
B Durchmesser des kleinsten umschreibenden Kreises um das entwickelte Silberfadenknäuel

X max maximaler Fehler

Dabei gingen sie von der Annahme aus, daß die Lage des primären Silberkeimes im getroffenen AgBr-Kristall unabhängig von der stattgefundenen Wechselwirkung zwischen der radioaktiven Strahlung und dem AgBr-Kristall sei.

Physikalische Entwicklung

Wird nun die Entwicklerlösung so eingestellt, daß die Auflösungsgeschwindigkeit relativ groß und die Reduktionskraft in der Lösung gering ist, so wird zunächst das ganze Silberbromidkristall aufgelöst, sodaß der primäre Silberkeim ganz von in Lösung befindlichen Silberionen umgeben wird. Das durch langsam einsetzende Reduktion entstehende Silber lagert sich nun gleichmäßig d.h. schalenförmig um den Primärkeim an. Auf diese Weise entstehen nahezu kugelförmige Körner. Der Mittelpunkt stellt mit einiger Genauigkeit die Lage des Primärkeimes dar. Der Durchmesser wird durch die Entwicklungsdauer bestimmt. Man spricht hier von physikalischer Entwicklung.

Die Auflösungsgeschwindigkeit ist durch die Wahl und die Konzentration der auflösenden Substanz, das reduzierende Potential durch die Konzentration der reduzierenden Substanz gegeben. Die Entwicklungsgeschwindigkeit wird durch pH und Anwesenheit weiterer Halogenanionen (z.B. J^-) beeinflusst.

Für die Autoradiographie im elektronenmikroskopischen Auflösungsbereich ist die physikalische Entwicklung anzustreben. Sie wurde erstmals von Caro und v.Tubergen (9) angewendet und später von

Salpeter und Bachmann (35), sowie von Lettre und Paweletz (24) weiter erprobt.

Aus dem Prinzip der physikalischen Entwicklung sind jedoch die Schwierigkeiten, die sich ergeben können, zu ersehen. Verwendet man nämlich bei geringer Entwicklungsgeschwindigkeit ein relativ zu starkes Lösungsmittel, so werden entweder nur kleinere Primärkeime entstanden durch die Wirkung tangentialer Treffer am Rande von Silberbromidkristallen, oder im ungünstigsten Falle alle Silberkeime aufgelöst. Auch werden zu starke (saure) oder zu lange dauernde Fixierbäder kleine Körner wieder auflösen können. Eine zu kurz gewählte Entwicklungszeit wird ebenfalls ein falsches negatives Ergebnis vortäuschen. Es erwies sich als sinnvoll, zunächst einige Präparate einer Versuchsreihe nach der Exposition einer chemischen Entwicklung zu unterziehen. Danach wird die Zusammensetzung der Entwicklerlösung durch Veränderung des pH bzw. durch Zugabe von Jodid⁻-Anionen so variiert, daß die Bedingungen für die physikalische Entwicklung gegeben sind. Damit erreicht man eine hohe Auflösung (durch die Darstellung eines tatsächlichen Kornes anstatt eines Silberfadenknäuels) und hat gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit, keine getroffenen Primärkeime unterdrückt zu haben. Es verhalten sich die verschiedenen Emulsionen, sowie auch einzelnen Chargen gegenüber dem Entwickler unterschiedlich, sodaß Entwicklungszeit und Zusammensetzung jedesmal geringfügig variiert und neu eingestellt werden müssen.

Abb. 7 A-D zeigt den Übergang von der fast physikalischen zur chemischen Entwicklung von Emulsionsfilmen, die dem Tageslicht ausgesetzt waren.

Zusammensetzung des angewendeten Entwicklers

1,25 Na_2SO_3 sicc.	1,00 ml 10%ige KJ Lösung
3,00 $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$	1,00 ml abs. Alkohol
0,11 p-Phenylendiamin	ad 100 ml aqua dest..

Die Lösung muß für jeden Versuch neu angesetzt und filtriert werden. Entwicklungszeit 10 bis 15 Minuten bei 20°C.

Der geringfügige Zusatz von Äthanol setzt die Oberflächenspannung herab, sodaß eine gleichmäßige Benetzung des Emulsionsfilmes sowie der anderen Schichten auf der Blende erreicht wird. Nach der Exposition bei geringer Luftfeuchtigkeit sind die verschiedenen Schichten besonders empfindlich gegenüber Spannungen. Diese entstehen wahrscheinlich dann, wenn einzelne Anteile der verschiedenen Schichten ungleichmäßig schnell befeuchtet werden. Wir konnten feststellen, daß durch diesen Zusatz die Ausschußrate herabgesetzt

wurde. Da die feuchte Emulsion sehr empfindlich ist, wird jede Blende in eine Pinzette eingespannt, in der sie während der Entwicklung, Fixierung, Wässerung und Trocknung verbleibt. Bei gleichzeitiger Bearbeitung mehrerer Blenden werden die Pinzetten gekennzeichnet. Ein Plastilinblock auf der kalten Heizplatte des Magnetrührgerätes dient für die Pinzetten als Halterung. Die Präparate werden so senkrecht in die jeweilige Lösung eingetaucht, welche durch einen kleinen Magnetrührer ständig in Bewegung gehalten wird. Auf diese Weise wird einmal eine gleichmäßige Entwicklung und Fixierung gewährleistet, zum anderen wird die Auskristallisation von Substanzen der jeweiligen Lösung hintangehalten. Im Anschluß an die Entwicklung wird die noch anhaftende Lösung mit Filterpapier von der Blende abgesaugt und durch mehrmaliges Eintauchen in aqua dest. gründlich abgespült.

Theoretisch soll bei der physikalischen Entwicklung eine Fixierung nicht mehr nötig sein. Da jedoch die Silberbromidkristalle nicht alle gleich groß sind, ist eine Fixierung zu empfehlen bzw. notwendig. Die Silberbromidkristalle mit dem größeren Durchmesser treten sonst, falls sie bei der Entwicklung nicht gänzlich aufgelöst wurden, als kleine runde Körner in Erscheinung und verfälschen so das Ergebnis. Wir verwendeten als Fixierbad eine 5%ige Natriumthiosulphat-Lösung bei einer Fixierzeit von 3 Minuten.

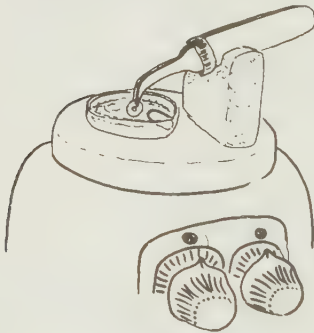


Abb. 5

Abb. 5 zeigt die Anordnung der Hilfsmittel für die Entwicklung und Fixierung.

Im Anschluß an die Fixierung wird die noch anhaftende Lösung wieder mit Filterpapier von der Blende gesaugt und anschließend gewässert. Dies erfolgt durch Eintauchen der Blenden jeweils 20 bis 30 mal in fünf verschiedene mit 50 ml

aqua dest. gefüllte Bechergläser. Nach dem Trocknen an der Luft und im Trockenschrank wird das Präparat aus der Pinzette genommen und kann danach, besonders wenn das Objekt schon kontrastiert wurde, im Elektronenmikroskop untersucht werden.

Entfernung der Gelatine

Die auf dem Objekt noch liegende Gelatineschicht mindert die Durchstrahlbarkeit herab, wodurch die genaue Beurteilung oft erschwert wird.

Zur Entfernung der Gelatine wurden die verschiedensten Wege beschritten. Silk und seine Mitarbeiter (37) lösten sie teilweise mit Wasser heraus. Hampton und Quastler (16) sowie Przybylski (33) verwendeten Gelatine andauende Enzyme. Hay und Revel (19) arbeiteten mit 0,05%iger Natronlauge bzw. sie entfernten die Gelatine beim Kontrastieren mit alkalischen Bleisalzen. Da die Gelatine für die entwickelten Körner die feste Lagerung auf dem Objekt darstellt, besteht die Gefahr, daß sie beim Entfernen der Gelatine aus ihrer ursprünglichen Lage bewegt werden. Um diesen unkontrollierbaren Fehler zu vermeiden, empfahlen Meek und Moses (28) die Gelatine unter Sichtkontrolle im Elektronenmikroskop durch Steigerung der Intensität des Elektronenstrahles langsam zu verkochen. Dieses Verfahren ist jedoch bei Lochblenden nur mit größter Vorsicht anzuwenden, da der Formvafilm sehr leicht bei zu hoher Intensität des Elektronenstrahles zerstört wird.

Die Kontrastierung der Zellbestandteile erfolgte entweder nach dem Schneiden oder nach Abschluß aller anderen Arbeitsgänge. Wir verwendeten Uranylacetat oder alkalisches nach der Methode von Karnovsky (21) hergestelltes Bleisalz zum Kontrastieren.

Befunde

Nach Erprobung der bisher veröffentlichten autoradiographischen Methoden entschlossen wir uns für die Schlingenmethode. Wir variierten die Fertigung des Emulsionsfilmes und dessen Auflagerung auf das biologische Material derart, daß wir leicht mit einer Nylonschlinge einen dünnen und einschichtigen Film erzeugen konnten, in dem die Silberbromidkristalle sehr dicht gepackt sind und der gleichzeitig sehr dicht dem Objektschnitt, aus den oben beschriebenen Gründen, anliegt.

Abb. 6 zeigt einen so angefertigten Film der Emulsionen NUC 3.07 und L4. Wir entwickelten unsere Autoradiogramme sowohl auf chemische als auch auf physikalische Weise. Die folgenden Befunde stellen die Ergebnisse dieser Versuche dar.

1. H^3 Thymin markierte Epithelzellen aus den Dünndarmkrypten der Ratte.

Diese Zellen besitzen neben den Zellorganellen einen großen Kern, dessen Form der langgestreckten zylindrischen Gestalt des Zellleibes angeglichen ist. Der Zellkern wird von einer Doppelmembran begrenzt, sein Karyoplasma besitzt elektronenmikroskopisch zwei verschiedene Anteile. Auffällig sind einmal die dichteren Bestandteile, die sich auch häufig am Rand des Zellkernes befinden. Da-

zwischen erkennt man auch schon bei kleinerer Vergrößerung weniger dunkle Areale von fast körnigem Aussehen.

Bei der chemischen Entwicklung und gleichzeitiger Anwendung einer etwas grobkörnigen Emulsion (NUC 7.15) der Autoradiogramme findet man die Silberfilamente über den Kernen. Sie liegen bei diesem Entwicklungsverfahren häufig über oder unmittelbar an den dunkleren Kernanteilen. Hierzu Abb. 8 u. 9. Bei Anwendung der physikalischen Entwicklung und der Emulsion L4 erhielten wir sehr viel kleinere und zum Teil fast kugelförmige Silberkörner. Diese findet man bei den H-Thymidin markierten Darmepithelzellen wieder über den Zellkernen. Bei kleinerer Übersichtsvergrößerung kann man im Elektronenmikroskop deutlich zwischen markierten und unmarkierten Kernen unterscheiden. Hierzu Abb. 10. Es gelingt außerdem eine deutliche Zuordnung der Silberkörner zu den dunkleren Bezirken des Kernes. Dabei sieht man häufig Gruppierungen von zwei oder drei derartigen Körnern dicht beieinander. Bei höherer Vergrößerung wird die Gestalt der elektronendichteren Kernbezirke deutlicher. Neben zart netzig erscheinenden Anteilen erkennt man solche, die eine schärfere Begrenzung zu haben scheinen. Das zwischen diesen beiden Anteilen liegende Material erscheint locker gefügt. Die Silberkörner findet man über den dunkleren Bezirken und zwar sowohl über den Plaques als auch über den netzig aufgelockerten Stellen. Vereinzelt befinden sie sich auch über helleren Anteilen des Karyoplasmas. Hierzu Abb. 11.

2. H^3 Thymidin markierte Zellen aus dem Rattenhoden.

Die Hodenzellen weisen abgesehen von der Größe und Gestalt des Zellleibes im Elektronenmikroskop sehr ähnliche Strukturen auf. Sie erscheinen mehr abgerundet, wie das auch im histologischen Präparat zu erkennen ist. Im Zytoplasma findet man neben Ergastoplasma und freien Ribosomen auch noch Mitochondrien, die sich von anderen durch das Fehlen von Cristae oder Tubuli unterscheiden. Der mehr kugelförmige Kern wird durch eine deutliche Doppelmembran begrenzt. Im Karyoplasma fallen besonders bei höherer Vergrößerung die synaptinimalen Komplexe auf, die von den dunkleren Anteilen des Kernes umgeben werden. Diese dunkleren Bezirke scheinen aus einem dichten Geflecht von dünnen Filamenten gebildet zu sein, das sich am Rand dieser Areale auflockert. Einzelne dieser Filamente lassen sich auch in den helleren Anteilen des Karyoplasmas verfolgen. Die Silberkörner, es wurde hierbei die Emulsion NUC 3.07 verwendet, befinden sich sehr genau über den Kernen. Schon bei kleinerer elektronenmikrosko-

pischer Vergrößerung lassen sich diese mit den dunkleren Bezirken in Beziehung bringen. Vereinzelt finden sie sich auch über helleren Abschnitten des Kernes. Bei höherer Vergrößerung liegen jedoch auch diese über dichteren Strukturen nahe den großen dunklen Arealen des Kernes. Hierzu Abb. 12 u. 13. Man findet bei der Verwendung dieser feinkörnigen Emulsion seltener Anordnungen zweier oder mehrerer Silberkörner eng neben einander. Vielmehr erscheint jedes entwickelte Korn bei diesen Autoradiogrammen unabhängig von einander zu liegen.

3. H^3 Thymidin markierte Ehrlich Ascites Tumorzellen.

Diese Zellen erscheinen im Schnitt nicht zu einem geweblichen Zusammenhang gefügt. Ihre Zelloberfläche ist mit Mikrovilli ausgestattet. Im Zytoplasma finden sich reichlich freie Ribosomen, Ergastoplasma und Mitochondrien. Die Form der Kerne ist sehr verschiedenartig. Häufig findet man in ultradünnen Schnitten die Kerne so dargestellt, daß zwei isolierte Kernanteile in Erscheinung treten. Der Kern ist wiederum von einer Doppelmembran begrenzt, deren Spalt manchmal jedoch nicht deutlich zu erkennen ist. Bei diesen Zellen findet man häufig Einstülpungen der inneren Kernmembranlamelle, wie Yasuzumi und seine Mitarbeiter (40) sowie Merker und seine Mitarbeiter (29) sie schon beschrieben haben. Das Karyoplasma erscheint bei kleiner Vergrößerung homogener als bei den vorherbeschriebenen Zellarten. Bei genügend hoher Vergrößerung jedoch lassen sich am Kernrand dichtere Anteile abgrenzen, die gegen das Innere des Kernes von netzig lockeren Strukturen abgelöst werden. Die physikalisch entwickelten Körner im Autoradiogramm finden sich über den Kernen der Tumorzellen. Es lassen sich die unmarkierten Kerne deutlich von den markierten unterscheiden. Bei höherer Vergrößerung lassen sich diese Körner den netzig aufgelockerten Anteilen des Karyoplasmas zuordnen. Hierzu Abb. 14.

4. In H^3 Thymidin haltiger Nährlösung gezüchtete Hefezellen.

Die Hefezellen, die im Schnitt als solitäre Gebilde oder als Zellhaufen in Erscheinung treten können, besitzen gegenüber den Warmblüterzellen einen Zellwall. Im Elektronenmikroskop erscheint dieser bei genügend hoher Vergrößerung als hellere Umrandung, die nach außen durch eine elektronendichtere Kapsel scharf abgegrenzt wird. Zum Zellinneren hin ist diese Abgrenzung jedoch nicht so gut möglich. Ebenso gelingt es mit den üblichen Kontrastierungsmethoden bei vorher erfolgter Fixation mit Glutaraldehyd und Osmiumsäure nur schwer, die Strukturen der Zellorganellen klar zur Darstellung

zu bringen. In Längsschnitten erkennt man die Sproßnarbe als zipfelige Ausbuchtung (1,3,18). Hierzu Abb. 15 u. 16.

Im Autoradiogramm findet man nur wenige entwickelte Körner über dem Zellinneren. Sie sind aus den schon erwähnten Gründen nicht klar den Zellorganellen oder dem Kern zuzuordnen. Hierzu Abb. 15 C u. 16 B. Man findet jedoch bei einer Vielzahl der mit H^3 Thymidin haltiger Nährlösung gezüchteten Hefezellen die physikalisch entwickelten Körner über dem Zellwall. Diese bei kleinerer Übersichtsvergrößerung nur ungenau zuzuordnenden Silberkörner findet man in der Leerwertkontrolle nicht. Im Leerwert wurden ohne H^3 Thymidin angezüchtete Hefezellen des gleichen Stammes autoradiographisch untersucht. Ebenso findet man in Serienschnitten immer über dem Zellwall der gleichen Hefezellen diese Anordnung der Silberkörner. Hierzu Abb. 16. Bei genügend hoher Vergrößerung wird erkennbar, daß die Mittelpunkte der Silberkörner mit großer Genauigkeit sehr häufig über der elektronendichteren äußeren Kapsel liegen. Einige wenige lagen mit ihrem Mittelpunkt über dem hellen Teil des Zellwalles und nur vereinzelt konnten wir sie mit ihrem Mittelpunkt außerhalb der äußeren Kapsel finden.

Diskussion

Die Lokalisation des H^3 Thymidins ist mit Hilfe der Autoradiographie elektronenmikroskopisch möglich.

Die autoradiographischen Befunde zeigen nun, daß das H^3 Thymidin in die Strukturen des Zellkernes eingebaut wird. Dieser Einbau geht während der DNS-Synthese vor sich, da Thymidin einen spezifischen Baustein der DNS darstellt. Die Lokalisation der durch die radioaktive Strahlung und anschließende Entwicklung entstandenen Silberkörner darf also über den Kernen erwartet werden, dies bestätigen auch die Ergebnisse der bisher veröffentlichten Arbeiten der Autoren Budd u. Pelc (8), Hay u. Revel (19), Meek u. Moses (28) und Oehlert u. Lesch (32).

Im normalen elektronenmikroskopischen Bild ist es schwierig, die RNS und DNS haltigen Strukturen zu unterscheiden. Verschiedene Autoren nehmen übereinstimmend an, die DNS sei in filamentösen Strukturen zu suchen, deren Dicke zwischen 40 und 200 Å je nach Zellart schwanken soll. Die mehr granulären Strukturen des Karyoplasmas sollen dagegen RNS enthalten (4,5,11,19). Eine Unterscheidung zwischen granulären Strukturen und Querschnitten von Filamenten ist jedoch elektronenmikroskopisch nicht immer möglich. Da die Kernsäuren selbst die Osmiumsäure nicht reduzieren, können

sie als solche durch die Osmiumfixierung allein nicht kontrastreich genug dargestellt werden. Vielmehr erfaßt man wahrscheinlich auf diese Weise an Protein gebundene Komplexe der RNS bzw. DNS (2, 34). Erst durch die Kontrastierung mit Bleisalzen und Uranylacetat unter bestimmten Bedingungen werden die Kernsäuren als solche deutlicher erkennbar (20, 38, 39). Bernhard und Leduce (6) konnten zeigen, daß unter Einwirkung von DNS hydrolysierendem Ferment die elektromendichteren Areale im Kern aufgelockert werden bzw. ganz verschwinden. Da H^3 -Thymidin nur in die DNS eingebaut wird, sind die Kernabschnitte, in denen eine DNS-Neosynthese stattgefunden hat, bzw. die Lokalisation dieser neusynthetisierten DNS mit Hilfe der elektronenmikroskopischen Autoradiographie genauer zu bestimmen.

Bei den Warmblüterzellen fanden wir entsprechend die Mehrzahl der Silberkörner über den dunklen Plaques des Karyoplasmas. Man kann deshalb annehmen, daß in ihnen die neusynthetisierte DNS enthalten ist. Bei den Autoradiogrammen der Hodenzellen konnten die Silberkörner häufig nahe den synaptinemalen Komplexen beobachtet werden. Von ihnen nimmt man an, daß sie die zentralaxiale Struktur der kontrahierten DNS darstellen, die im Lichtmikroskop als Chromosom in Erscheinung treten (30).

Auffällig war die häufige Lokalisation der Silberkörner an den Rändern dieser dunkleren Bezirke. Dies läßt die Vermutung zu, daß die jüngeren DNS-Fraktionen im äußeren Bereich der dunklen Plaques angereichert sind.

Die Befunde der Autoradiogramme der mit radioaktivem Thymidin gezüchteten Hefezellen zeigen dagegen ein anderes Bild. Hier entsprach die Lokalisation der Silberkörner über dem Zellinneren dem erwarteten Einbau des Metaboliten in die DNS der Hefezellen. Der zahlenmäßig geringe Anteil dieses Einbaues (es wurde eine Verdoppelung bis Verdreifachung der Hefezellen in dieser Zeit mittels Sedimentation festgestellt) entsprach jedoch nicht den Erwartungen. Entweder ist die DNS-Synthese bei den Hefezellen nicht proportional mit ihrer Vermehrung, oder aber das radioaktive Thymidin gelangte in dieser Zeit in nur geringem Maße in das Innere der Hefezellen und konnte somit für die DNS-Synthese nicht zur Verfügung stehen.

Unerwartet war hier ebenfalls die Lokalisation der Silberkörner über dem Zellwall. Da diese Körner im Leerwert nicht gefunden wurden, kann angenommen werden, daß an diesen Stellen tatsächlich

strahlendes Thymidin gelegen hat. Unklar ist jedoch die Bedeutung dieser Lokalisation. Das H^3 Thymidin könnte durch eine lockere Bindung an dem Zellwall derartig festgehalten worden sein. Die Ursache könnte eine Art lockeres unspezifisches "Klebenbleiben" verschiedener Anteile der Nährlösung am Zellwall sein. Da aber durch die Präparationstechnik wäßrige und fettlösliche Bestandteile größtenteils herausgelöst werden, dürfte das gut wasserlösliche Thymidin ebenfalls vom Zellwall entfernt worden sein. Dann aber wäre eine festere Bindung des H^3 Thymidins am Zellwall zu fordern. Welcher Natur diese ist, ob etwa z.B. das H^3 Thymidin in dem Zellwall durch eine erst in der Inkubationszeit mit dem Thymidin durch Induktion entstandene spezifische Permease festgehalten und für den Transport in das Zellinnere bereitgestellt wurde, kann hier zur Zeit nur vermutet werden.

Wenngleich eine endgültige Interpretation dieser Befunde noch nicht gegeben werden kann, läßt sich doch hier das Auflösungsvermögen und die Lokalisationsgenauigkeit der verbesserten Methode gut verdeutlichen. Da nämlich eine Lokalisationsabweichung der Silberkörner senkrecht (in der Schnittebene) zum Zellwall nach außen kaum gegeben ist, darf angenommen werden, daß sie in tangentialer Richtung ebenso wenig vorhanden ist. Dies würde aber bedeuten, daß die Strahlungsquelle und somit die nachzuweisende Substanz mit sehr großer Genauigkeit unter den Mittelpunkten der Silberkörner zu suchen ist. Die selbe Genauigkeit darf aber dann auch für die Autoradiogramme der anderen Zellarten angenommen werden, bei der die gleiche Methode angewendet wurde.

Diese gewonnene Verbesserung des Auflösungsvermögens und der Lokalisationsgenauigkeit ist nach unserer Meinung auf folgende Punkte zurückzuführen: 1. Die Bereitung und Anwendung eines möglichst dünnen und trotzdem dichtgepackten Emulsionsfilmes und dessen enge Auflagerung auf die Objektschnitte. 2. Die Ausschaltung von "background"-begünstigenden Einflüssen, besonders den des Kupfers durch die Verwendung von Silberlochblenden. 3. Die gezielte Anwendung der physikalischen Entwicklung durch Variation der Entwicklerlösung. Dadurch werden alle durch die radioaktive Strahlung des zu untersuchenden Substrates im Gewebe getroffenen Silberbromidkristalle als einzelne runde Silberkörner sichtbar, unter deren Mittelpunkt die Strahlungsquelle liegt.

Ungelöste Probleme

In der lichtmikroskopischen Autoradiographie ist durch die Unter-

suchung von Schnitten mit der Dicke eines Zelldurchmessers bzw. von Zellausstrichen nach Verabreichung von Standard Dosen markierter Substanzen, eine quantitative Aussage möglich. Elektronenmikroskopisch ist dies dagegen schwierig, da immer nur sehr viel dünnere Schnitte und somit nur Teilstücke von Zellen zur Untersuchung gelangen können. Nimmt man z.B. den Durchmesser eines Zellkernes mit etwa 10 Mikron an, so erfaßt man in einem elektronenmikroskopischen Schnitt von etwa 1000 Å nur den zehnten Teil des Zellkernes und somit nur ebensowenig an eingebautem H^3 -Thymin. Dies gilt aber nur dann, wenn ein ganz gleichmäßiger Einbau angenommen werden darf. Die Untersuchung von Serienschnitten bietet hier einen Ausweg. Jedoch ist dies nicht immer leicht möglich, da im kleinen elektronenmikroskopischen Betrachtungsfeld häufig Anteile dieser Serienschnitte dem Auge des Betrachters entzogen sind.

Ein weiteres ungelöstes Problem stellt die Untersuchung von Substanzen dar, die durch die bisher angewendete elektronenmikroskopische Einbettungstechnik herausgelöst werden.

Wir verwendeten für unsere Untersuchungen mit Tritium markiertes Thymin, dessen Stoffwechsel durch biochemische und lichtmikroskopische Untersuchungen weitgehend bekannt ist. Seine Lokalisation in der DNS wird durch die präparativen Arbeitsgänge nicht beeinflusst. Die Untersuchung von Substanzen, die sich leichter wieder aus dem Gewebe entfernen lassen, wird nur dann möglich sein, wenn eine entsprechende Einbettungstechnik entwickelt worden ist, und der betreffende Stoffwechsel durch die Ergebnisse anderer Fachrichtungen näher bekannt ist.

Abschließend kann gesagt werden, daß die hier dargelegte Methode dem Morphologen Einblicke in die dynamischen Vorgänge der Zelle gestattet.

Zusammenfassung

Es wurde in H^3 -Thymin markierten Warmblüterzellen die Lokalisation der neusynthetisierten DNS mit Hilfe der Autoradiographie elektronenoptisch festgestellt. Die Erzeugung des Emulsionsfilmes und seine Aufbringung auf die Objektschnitte erfolgte nach einer neuentwickelten Methode. Als Objektträger wurden selbst angefertigte Silberlochblenden verwendet. Die Lokalisationsgenauigkeit wurde durch gezielte Anwendung der physikalischen Entwicklung erhöht, was an Hand von allerdings noch nicht ganz geklärten Befunden markierter Hefezellen deutlich gezeigt werden konnte.

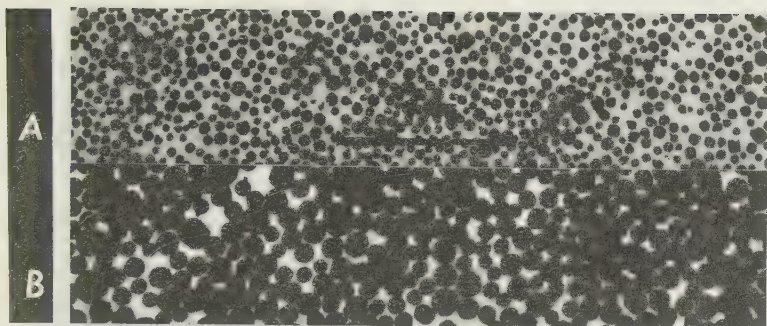


Abb.6

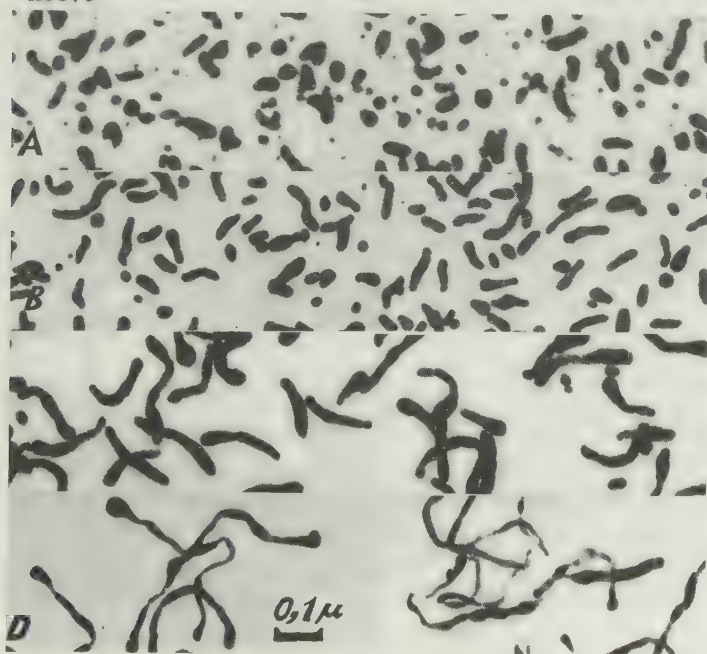


Abb.7

Abb.6. Elektromikrogramme einschichtiger Emulsionsfilme
A. NUC 3.07, B. L4. Vergr. ca. 35.000 fach.

Abb.7. Elektromikrogramme entwickelter Emulsionsfilme
(NUC 3.07, mit Tageslicht belichtet). A-D. Übergang von
fast physikalischer zu chemischer Entwicklung.
Vergr. 90.000 fach.

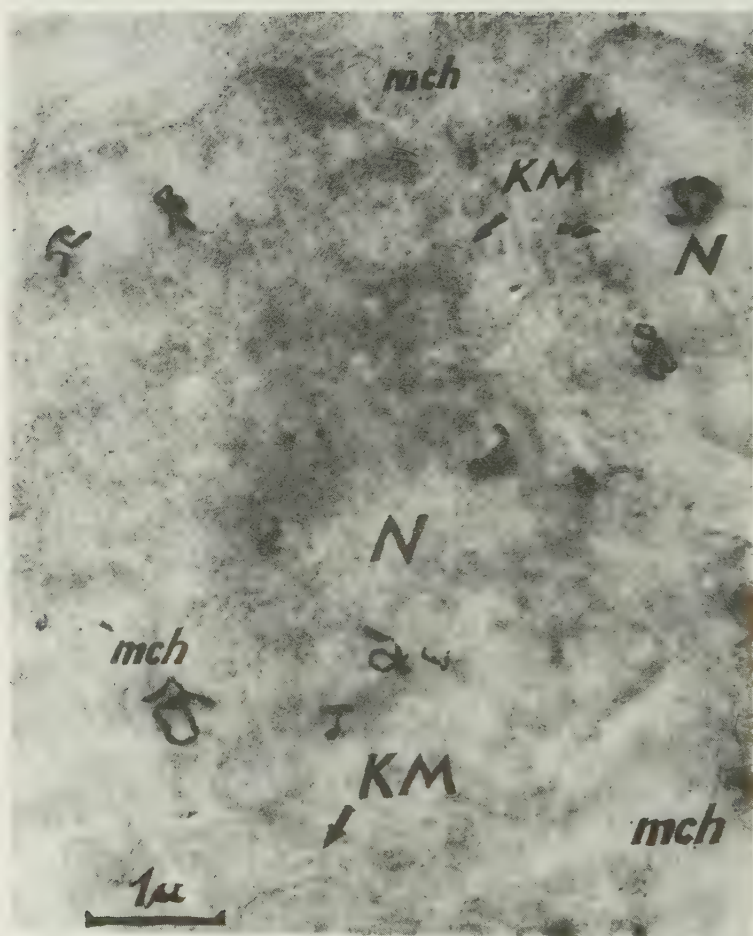


Abb.8. Elektr.mikrosk.Autoradiogramm einer H^3 Thymidin-
markierten Dünndarmepithelzelle aus einer Krypte.
Chemische Entwicklung, NUC 7.15. Vergr.27.000fach.
N Kern, mch Mitochondrien, KM Kernmembran.

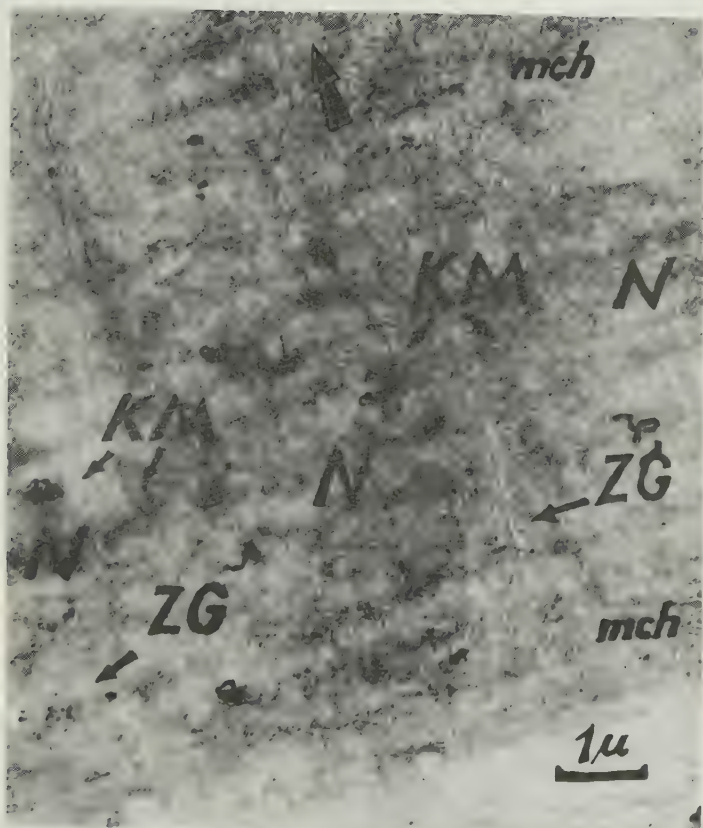
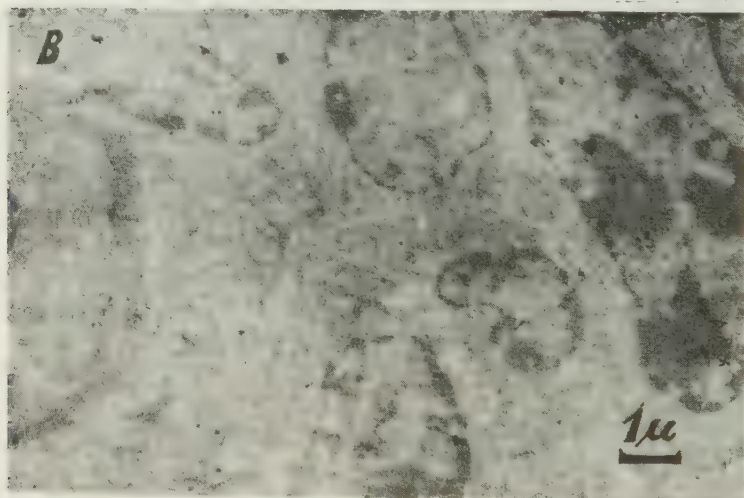


Abb.9. Elektr.mikrosk.Autoradiogramm einer H^3 -Thymidin-markierten Krypte.Basaler Anteil eines Querschnittes.Chemische Entwicklung, NUC 7.15. Vergr.18.000 fach. N Kern, mch Mitochondrien, KM Kernmembran, ZG Zellgrenze.Der Pfeil zeigt in Richtung des Drüsenschlauchlumens.



Abb.10. Elektr.mikrosk.Autoradiogramm H^3 Thymidin-mark. Dünndarmkrypten.Physikalische Entw. L4. A,Basaler Anteil eines Querschnittes, Vergr.6.000 fach. B.Mehr zum Lumen hin befindlicher Tangentialschnitt, 12.000 fach.



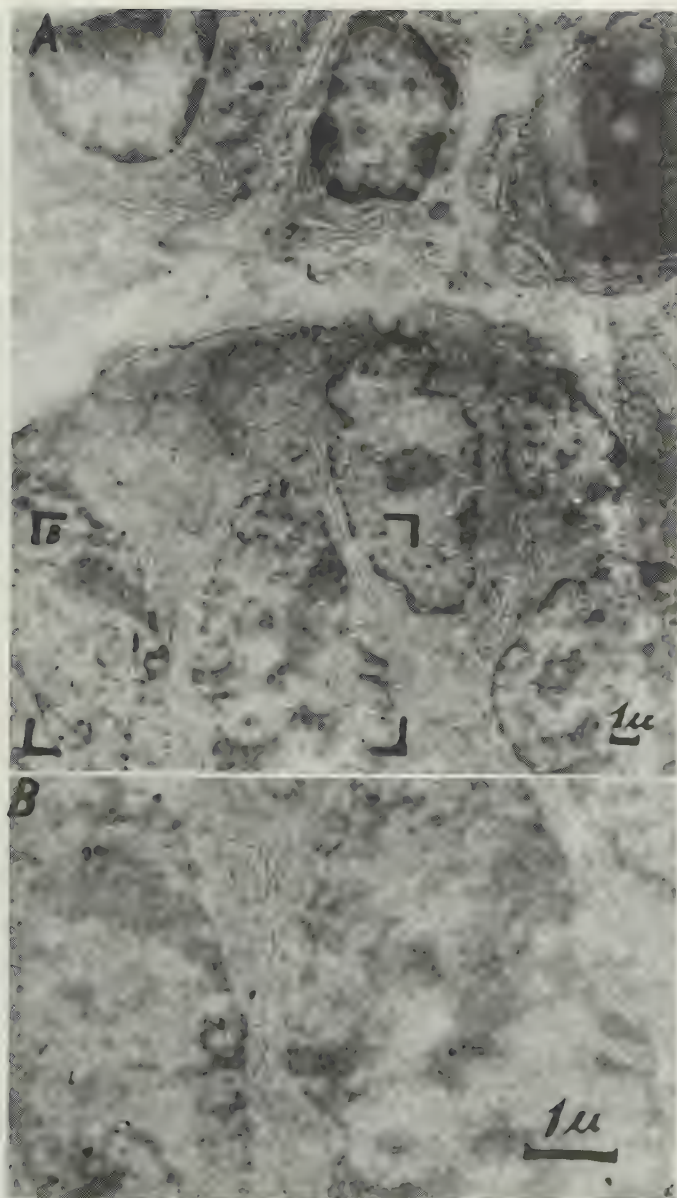


Abb.11.Gleiches Material wie Abb.10.

A.Vergr.6.000 fach, B.Vergr.18.000 fach.

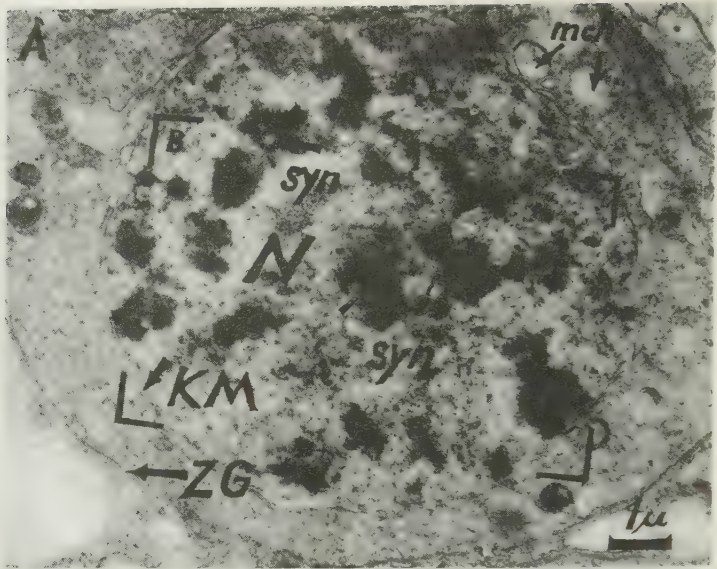
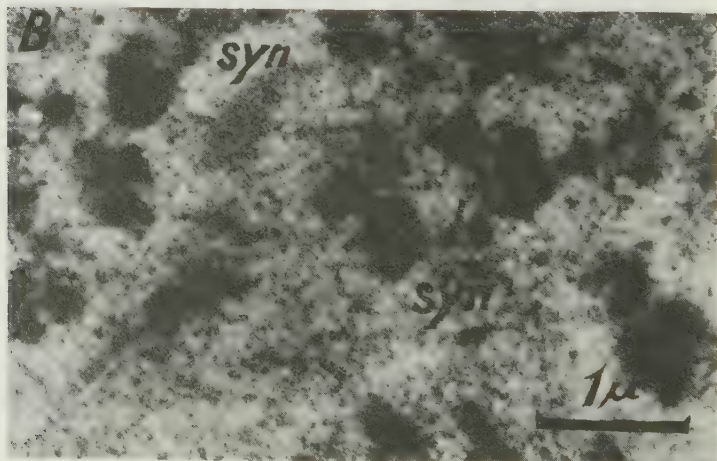


Abb.12. Elektr.mikrosk.Autoradiogramm einer Spermatocyte 1.Ord. H^3 -Thymidin-mark.;physik.Entw. NUC 3.07.Gelatine durch Verkochen weitgehend entfernt.

N Kern, KM Kernmembran, syn synaptinemale Komplexe, mch Mitochondrien, ZG Zellgrenze.

A. Vergr.12.000 fach, B. Vergr.30.000 fach.



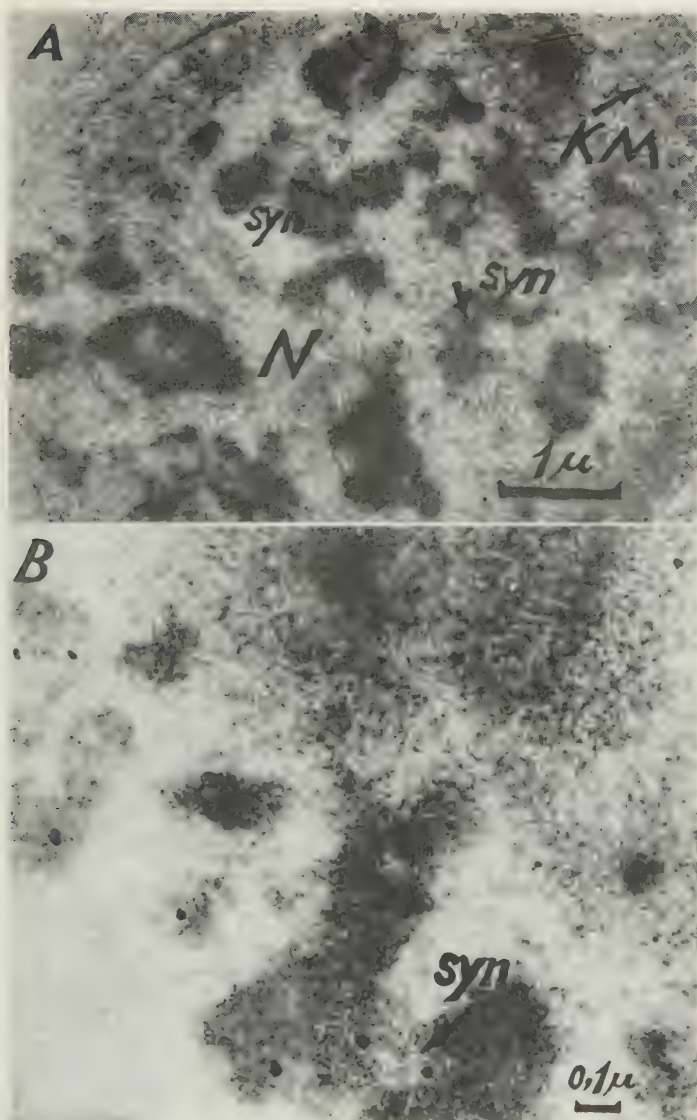


Abb.13. Gleiches Material wie Abb.12.

A. Vergr. 24.000 fach, B. Vergr. 84.000 fach.

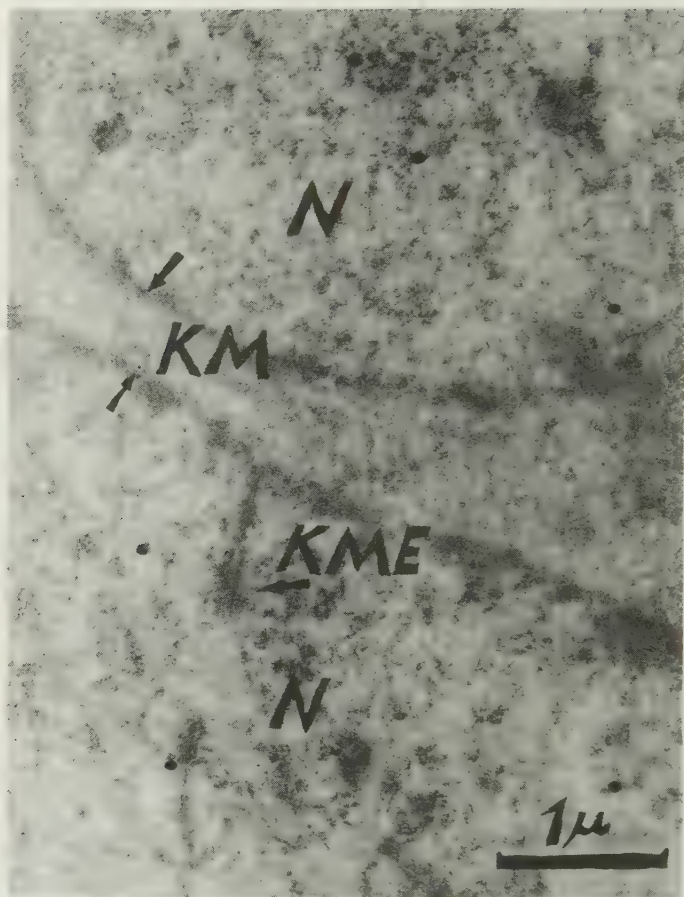


Abb.14. Elektr.mikrosk.Autoradiogramm einer Ehrlich-Ascites-Tumorzelle, Ausschnittvergrößerung mit Kernanschnitt; physik.Entw. NUC 7.15. Vergr. 33.000 fach. N Kern, KME Kernmembraneinstülpungen, KM Kernmembran.



Abb.15. Elektr.mikrosk.Autoradiogramm von H^3 -Thymidin-mark. Hefezellen; A.u.B. Ausschnittvergr.60.000 fach. C.Querschnitt Vergr.24.000 fach; physik.Entw.NUC 7.15. SN Sproßnarbe, aK äußere Kapsel.

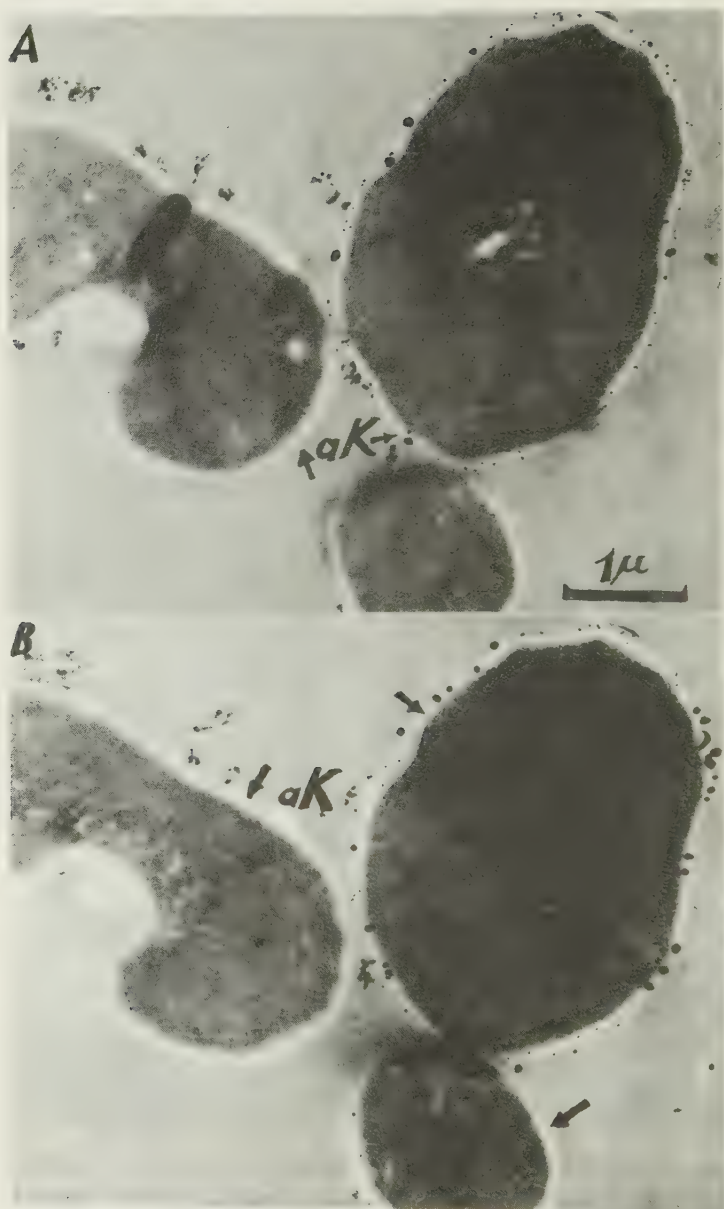


Abb.16. Gleiches Material wie Abb.15. Serienschritte.
Vergr. 24.000 fach.

Herrn Professor Dr.med.Willy Schwarz möchte ich hiermit für die freundliche Überlassung des Themas sowie für seine wertvollen Ratschläge aufrichtig danken.Ebenso gilt mein Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Forschungsabteilung, die zum Gelingen der Arbeit durch die gute und freundliche Zusammenarbeit beigetragen haben.

Gleichzeitig möchte ich mich für die Ratschläge und die Unterstützung meiner Arbeit durch den Lehrstuhl für Angewandte Photochemie und Filmtechnik an der Technischen Universität Berlin bedanken.

Lebenslauf

Als Sohn des Architekten Dipl. Ing. Gerhard Neuber und seiner ersten Frau Ursula geb. Küttner wurde ich am 11. Nov. 1938 in Nürnberg geboren. Während meiner Kindheit, die unter dem Eindruck des zweiten Weltkrieges stand, lebte ich in Pirna bei Dresden. Dort besuchte ich die Grundschule. Wegen der Verhältnisse im kommunistisch regierten Teil Deutschlands nach dem Krieg wurde ich 1949 nach Österreich gebracht, wo ich bis 1954 in dem College Stella Matutina in Feldkirch-Vorarlberg lebte und das angeschlossene humanistische Gymnasium besuchte.

Von 1954 bis 1959 lebte ich in Geldern-Niederrhein, besuchte das dortige Kreisgymnasium und bestand Ostern 1959 die Reifeprüfung.

Anschließend leistete ich 12 Monate Grundwehrdienst bei der Bundeswehr.

Bedingt durch mein Vorhaben Maschinenbau mit dem Ziel, medizinische Feinwerktechnik zu studieren, absolvierte ich im Sommer 1960 ein halbjähriges Praktikum in der metallherzeugenden und verarbeitenden Industrie.

Nach zwei Semestern Maschinenbau-Studium an der Technischen Universität Berlin wechselte ich an die Medizinische Fakultät der Freien Universität und studierte dort vom WS 1961/62 bis zum WS 1966/67. Das Physikum bestand ich nach dem fünften Semester mit dem Gesamturteil sehr gut und die ärztliche Prüfung nach dem sechsten klinischen Semester mit dem Gesamturteil gut.

In der Zeit von Oktober 1965 bis November 1966 arbeitete ich in der Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie als Doktorand.

Am 21. März 1963 heiratete ich die Tochter des Kaufmannes Paul Zimmermann, Monika, wir haben einen Sohn und eine Tochter.

